

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Mai 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/35967 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: A61K 31/715,
A61P 9/04

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11441

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. November 2000 (17.11.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 55 803.5 19. November 1999 (19.11.1999) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): KNOLL AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67061 Ludwigshafen (DE).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERR, Dieter [DE/DE]; Hardenburgstr. 19, 67122 Altrip (DE). HAHN, Alfred [DE/DE]; Isoldestrasse 27, 68199 Mannheim (DE). LAUX, Volker [DE/DE]; St. Sebastianstr. 27, 55128 Mainz (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter, Kinzebach & Partner, Sternwartstr. 4, 81679 München (DE).

(54) Title: HEPARANASE INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF HEART FAILURE

(54) Bezeichnung: HEPARANASE-INHIBITOREN ZUR BEHANDLUNG VON HERZINSUFFIZIENZ

(57) Abstract: The invention relates to the use of heparanase inhibitors for the treatment of heart failure, especially congestive heart failure, and related indications, symptoms and/or dysfunctions such as peripheral edema, pulmonary and liver congestion, dyspnea, hydrothorax and abdominal dropsy. The invention also relates to a method for producing pharmaceutical agents used to treat heart failure.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Heparanase-Inhibitoren zur Behandlung von Herzinsuffizienz, insbesondere kongestiver Herzinsuffizienz, und damit zusammenhängenden Anzeichen, Symptomen und/oder Fehlfunktionen, wie peripheren Ödemen, Lungen- und Leberkongestion, Dyspnoe, Brust- und Bauchwassersucht, und Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Mittel zur Behandlung von Herzinsuffizienz.

WO 01/35967 A1

BEST AVAILABLE COPY

Heparanase-Inhibitoren zur Behandlung von Herzinsuffizienz.

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung wenigstens eines Heparanase-Inhibitors zur Behandlung von Herzinsuffizienz und damit zusammenhängenden Anzeichen, Symptomen und/oder Fehlfunktionen und Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Mittel zur Behandlung von Herzinsuffizienz.

- 10 Proteoglykane sind polyanionische Substanzen hohen Molekulargewichts, in denen verschiedene Arten von Heteropolysaccharid-Ketten kovalent an ein Polypeptidrückgrat gebunden sind. Die ehemals als Mucopolysaccharide bezeichneten Polysaccharidgruppen der Proteoglykane werden neuerdings als Glycosaminoglykane bezeichnet.
- 15 Eine Vielzahl von Enzymen ist an dem Auf-, Um- und Abbau dieser Proteoglykane beteiligt. Durch Proteolyse können Glycosaminoglykane freigesetzt werden, die wiederum unter der Einwirkung von Glycosaminoglykan-Endoglycosidasen in kleinere Fragmente zerlegt werden, während entsprechende Exoglycosidasen Monosaccharide von
- 20 den nicht-reduzierenden Enden der Glycosaminoglykane freisetzen.

Heparansulfat (HS) und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) kommen auf der extrazellulären Oberfläche und in der extrazellulären Matrix vor. Die HS-Ketten werden im allgemeinen aus Clustern sulfatierter Disaccharid-Einheiten, vornehmlich 1-4 an α -Iduronsäure-Reste gebundene N-sulfatierte Glucosamine, gebildet, die durch wenig oder nicht sulfatierte Regionen, vornehmlich 1-4 an β -D-Glucuronsäure gebundene N-acetylierte Glucosamine, voneinander getrennt sind. Ihnen wird eine Hauptrolle in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen zugeschrieben, die an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind. Zu nennen sind hier beispielsweise die Adhäsion, Migration, Differenzierung und Proliferierung von Zellen. Berichten zufolge interagieren verschiedene Moleküle mit HS und/oder HSPG. Es handelt sich dabei entweder um Wachtstumsfaktoren (z.B. FGF, PDGF, VEGF), Cytokine (IL-2), extrazelluläre Matrixproteine (Fibronektin, Collagen), an der Hämostase beteiligte Faktoren (Heparin-Co-faktor II), oder um Moleküle anderer Natur, z.B. Lipoproteine, DNA-Topoisomerasen und β -Amyloidproteine (vgl. Hileman et al.

40 (1998) BioEssays 20, 156-167; Stringer and Gallagher (1997) Int. J. Biochem Cell Biol 29, 709-714; Rapraeger (1993) Curr. Opin Cell. Biol. 5, 844-853; Bernfield et al. (1993) Development 1993 Suppl. 205-212; Kjellen and Lindahl. (1991) Annu. Rev. Biochem. 60, 443-475; Schlessinger et al. (1995), Cell 83, 367-360;

45 Turnbull und Gallagher (1993) Biochem. Soc. Trans. 21, 477-482; Najjam et al (1997) Cytokine 9, 1013-1022; Ho et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 16838-16844; Pillarisetti et al (1997) J. Biol.

2

Chem. 272, 15753-15759; Kovalszky et al. (1998) Mol. Cell. Biol. 183, 11-23; Schulz et al. (1998) Eur. J. Neuroscience 10, 2085-2093).

- 5 Angesichts dieser vielfältigen Beteiligung ist HS/HSPG-modulierenden Enzymen besonderes Interesse entgegengebracht worden (Ernst et al. (1995) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 30, 387-444).

- Endoglycosidasen und insbesondere endo- β -Glucuronidase (im folgenden Heparanase genannt) fanden Beachtung, da sie mit der Metastasierung von Tumoren, entzündlichen Prozessen und der Leukozytenwanderung in Verbindung gebracht wurden (WO 95/24907; US-A-5,817,800; US-A-5,262,403; Vlodavsky et al. (1999) Genbank Accession Nr. AF 144325; Hulett et al. (1999) Nature Medicine 5, 803-809; Toyoshima and Nakajima (1999) J. Bio. Chem 274, 24153-24160). Tatsächlich wurde Heparanase ursprünglich in murinen metastatischen Melanomzellen entdeckt. Heparanase spaltet HS in charakteristische Fragmente hohen Molekulargewichts und diese Aktivität wurde mit dem metastatischen Potential der Melanomzellen korreliert (Nakajima et al. (1983) Science 220, 601-613; Nakajima et al. (1984) J. Biol. Chem. 259, 2283-2290). Infolge wurde eine erhöhte Heparanase-Aktivität in weiteren mobilen, invasiven Zellen aufgezeigt, beispielsweise in Zusammenhang mit Lymphomen, Mastocytomen, Adenocarcinomen, Leukämien und rheumatischen Fibroblasten.

- Gestützt auf diese Beobachtungen schlug man vor, Heparanase-Inhibitoren zu verwenden, um das invasive Potential von Zellen in Zusammenhang mit pathologischen Zuständen günstig zu beeinflussen. In diesem Sinne wird in der WO 99/43830 vermutet, daß Inhibitoren der Heparanase-Aktivität auch bei der Behandlung von Arthritis, Asthma und anderen entzündlichen Erkrankungen, vaskulärer Restenose, Atherosklerose, Tumorwachstum und -progression und fibroproliferativen Erkrankungen von Nutzen sein könnten, denn all diesen Zuständen liegt eine Einwanderung von Fremdzellen in das betroffene Gewebe bzw. Organ zugrunde.

- Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, neue therapeutische Anwendungen für eine Modulation der Heparanase-Aktivität bereitzustellen.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Inhibition der Heparanase-Aktivität eine Behandlung von Herzinsuffizienz ermöglicht.

3

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung wenigstens eines Heparanase-Inhibitors zur Behandlung von Herzinsuffizienz.

- 5 Unter Herzinsuffizienz (synonym: Myocardinsuffizienz, Herzmuskel-
schwäche, Insuffizienz cordis) versteht man erfindungsgemäß ein
Unvermögen des Herzens, die erforderliche Förderleistung zu er-
bringen. Der Begriff Herzinsuffizienz beschreibt den Zustand ei-
nes Herzes, in dem Kompensationsmechanismen wie Herzfrequenz,
10 Kontraktivität, Schlagvolumen, Hypertonie, nicht zur Aufrechter-
haltung eines normalen Herzzeitvolumens ausreichen. Es handelt
sich um eine Schwäche der Pumpenfunktion.

- Dieser Zustand kann bei Belastung (Belastungsinsuffizienz) oder
15 schon in Ruhe (Ruheinsuffizienz) auftreten. Je nach Schweregrad
wird gemäß der New York Heart Association (NYHA) unterschieden
zwischen Funktionsklassen I bis IV, d.h. einer völligen Beschwer-
defreiheit bei normaler körperlicher Belastung bis hin zu Insuf-
fizienzzeichen bei nahezu jeder körperlichen Tätigkeit, die häu-
20 fig auch in Ruhe bestehen.

Die Herzinsuffizienz kann das gesamte Herz (globale Herzinsuffi-
zienz) oder Teile davon betreffen, beispielsweise Links- oder
Rechtsherzinsuffizienz.

- 25 Erfindungsgemäß bevorzugt ist die Behandlung von Myokardinsuffi-
zienzen, d.h. Herzinsuffizienzen, die auf eine Veränderung des
Myokards zurückzuführen sind. Zu nennen sind in diesem Zusammen-
hang insbesondere Kardiomyopathien und vorzugsweise primäre Kar-
30 diomyopathien, beispielsweise durch Hypertrophie des Herzens, vor
allem des Kammerseptums und des linken Ventrikels gekennzeichnete
hypertrophe obstruktive oder nicht-obstruktive Kardiomyopathien
und durch Hypertrophie und Dilatation des Herzens gekennzeichnete
kongestive Kardiomyopathien (auch als dilatative kongestive Kar-
35 diomyopathien bezeichnet).

- Den erfindungsgemäß bevorzugt behandelten Formen von Herzinsuffi-
zienz, insbesondere kongestiver Herzinsuffizienz, liegen eine
oder mehrere der nachfolgend aufgezählten Veränderungen des Myo-
40 kards zugrunde: Hypertrophie einzelner oder aller Wandschichten,
Abnahme der Muskeldehnbarkeit, Herzvergrößerung, insbesondere
Ventrikelvergrößerung, insbesondere ohne Dickenzunahme der Ven-
trikelmuskulatur, Dickenabnahme der Ventrikelmuskulatur und fi-
brotische Veränderungen der Ventrikelmuskulatur.

4

Die erfindungsgemäß zu behandelnde Indikation Herzinsuffizienz ist in der Regel gekennzeichnet durch eine progressive Entwicklung, d.h. die vorstehend beschriebenen Zustände verändern sich im Laufe der Zeit, in der Regel nimmt der Schweregrad zu und gegebenenfalls können Zustände ineinander übergehen oder weitere Zustände zu bereits bestehenden Zuständen hinzutreten.

In diesem Sinne werden erfindungsgemäß insbesondere Veränderungen des Myokards behandelt, die unter dem Begriff "remodelling" zusammengefaßt werden; das sind Vorgänge, die Veränderungen in der Myokardiocyt-Struktur und/oder Veränderungen umgebenden Bindegewebes mit sich bringen.

Einem besonderen Aspekt zufolge werden Herzinsuffizienzen behandelt, denen eine Absenkung des pH-Wertes betroffener Herzteile vorausgeht oder diese begleitet. Werte im sauren pH-Bereich, in der Regel bei etwa 2 bis 6,5, bei etwa 3 bis 6 und vor allem bei etwa 4,5 bis 5,5 sind hier von Bedeutung.

Durch die erfindungsgemäße Behandlung von Herzinsuffizienz bzw. den ihr zugrundeliegenden Zuständen lassen sich eine Reihe weiterer Anzeichen, Symptome und/oder Fehlfunktionen behandeln, die mit Herzinsuffizienz zusammenhängen, d.h. insbesondere die oben beschriebenen Erkrankungszustände begleiten. Hierzu gehören beispielsweise Veränderungen des peripheren Kreislaufs, insbesondere Stauungserscheinungen im großen und/oder im kleinen Kreislauf, z.B. Lungen- und Leberkongestion, eine Verminderung der Blutversorgung der Kreislaupерipherie, Störungen der Atmung (Dyspnoe), der Nierenfunktion, z.B. Nykturie, und des Elektrolytstoffwechsels, z.B. periphere Ödeme, Brust- und Bauchwassersucht, etc. Diese Anzeichen, Symptome und/oder Fehlfunktionen bilden häufig Muster oder Gruppen, die als Syndrome bezeichnet werden, so daß sich erfindungsgemäß die Behandlung des Syndroms Herzinsuffizienz ergibt.

Eine Behandlung im erfindungsgemäßen Sinne umfaßt nicht nur die Behandlung akuter oder chronischer Anzeichen, Symptomen und/oder Fehlfunktionen, sondern auch eine vorbeugende Behandlung (Prävention). Ein Zweck der akuten oder chronischen Behandlung ist eine Behebung der Störungen, Regulation der Zustände, bzw. Linderung der Anzeichen, Symptome und/oder Fehlfunktionen. Einem besonderen Aspekt zufolge ist es Zweck der Behandlung, die Aktivität der Heparanase zu verringern. Ein Zweck der vorbeugenden (präventiven) Behandlung ist es, das Auftreten der Störungen, Zustände, Anzeichen, Symptome und/oder Fehlfunktionen zu vermeiden, wozu auch eine zeitliche Verzögerung des Auftretens zählt. Die Behandlung kann symptomatisch, beispielsweise als Symptomsuppression

5

ausgerichtet sein. Sie kann kurzzeitig erfolgen, mittelfristig ausgerichtet sein, oder es kann sich auch um eine Langzeitbehandlung, beispielsweise im Rahmen einer Erhaltungstherapie, handeln.

- 5 Der Begriff "Heparanase-Inhibitor" beschreibt Substanzen, welche die enzymatische Aktivität von Heparanase oder deren Expression inhibieren. Unter Inhibition wird in diesem Zusammenhang eine Verminderung der Enzymaktivität, vor allem der Aktivität als Endoglycosidase, Endoglucuronidase, β -Glucuronidase und insbesondere
- 10 Endo- β -Glucuronidase, bzw. der Expression von Heparanase verstanden. Die Enzymaktivität von Heparanase führt beispielsweise zur Spaltung von Glycosaminoglykanen, gegebenenfalls als Teil von Proteoglykanen, insbesondere von Heparansulfat, bzw. den entsprechenden Proteoglykane. Vorzugsweise bewirken erfindungsgemäße Heparanase-Inhibitoren eine Verringerung des HS- und HSPG-Abbaus durch Heparanase.

- Erfindungsgemäß bevorzugt sind Inhibitoren von Säuger-Heparanase (EC 3.2.1) und insbesondere von humaner Heparanase und vor allem
- 20 der durch die cDNA mit der SEQ ID NO:1 kodierten Heparanase mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2.

- Erfindungsgemäße Inhibitoren binden in der Regel an Heparanase oder an Heparanase kodierende Nukleinsäuren, z.B. DNA oder mRNA.
- 25 Unter Bindung versteht man jede molekulare Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Enzym bzw. Nukleinsäure, insbesondere unter physiologischen Bedingungen. Dies sind in der Regel klassische Wechselwirkungen, zu denen elektrostatische Kräfte, van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrücken-Bindungen, hydrophobe Bindungen, oder metallkomplexartige koordinative Bindungen gehören. Zusätzlich zu den vorstehend genannten, reversiblen molekularen Wechselwirkungen können auch irreversible Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Enzym in Betracht kommen, z.B. kovalente Bindungen.
- 30 In der Regel binden Enzym-Inhibitoren im Bereich der oder einer der aktiven Domänen von Heparanase und konkurrieren mit anderen Substraten um deren Bindungsstelle(n) (Kompetition). Dementsprechend versteht man unter kompetitiven Enzym-Inhibitoren diejenigen, die mit einem Vergleichssubstrat, im vorliegenden Fall vorzugsweise Heparansulfat, um die Bindung an Heparanase konkurrieren, d.h. die Bindung des einen behindert die Bindung des anderen. Wegen dieser Bindung an Heparanase können kompetitive Enzym-Inhibitoren auch als Heparanase-Substrat bezeichnet werden. Vorzugsweise handelt es sich bei diesen Inhibitoren um Substrate,
- 45 die im Vergleich zu dem oder den natürlichen Substraten der katalytischen Aktivität von Heparanase nicht oder zumindest weniger zugänglich sind, d.h. sie werden nicht oder in vergleichsweise

6

geringem Ausmaß durch Heparanase umgesetzt, insbesondere gespalten. Ebenfalls brauchbar sind nicht-kompetitive Inhibitoren, die beispielsweise im wesentlichen irreversibel an aktive Domänen, oder an anderer Stelle an die Heparanase binden und, beispielsweise über allosterische Effekte, Einfluß auf die Enzymaktivität nehmen.

Zumindest für den Fall der kompetitiven Inhibition gilt der Grundsatz, daß die Verdrängung eines Substrats durch einen Inhibitor mit abnehmender Bindungsaffinität des Substrats bzw. zunehmender Bindungsaffinität des Inhibitors zunimmt. Zweckmäßigerweise besitzen daher erfindungsgemäß brauchbare Inhibitoren eine hohe Bindungsaffinität für Heparanase. Eine derartig günstig ausfallende Bindungsaffinität gestattet eine wirksame Verdrängung natürlich vorkommender Enzymsubstrate, beispielsweise von Heparansulfaten und Heparansulfat-Proteoglykanen, wobei die erforderliche Konzentration an Inhibitor zur Bindung einer bestimmten Menge dieses Inhibitors an das Enzym bzw. zur Verdrängung einer bestimmten Menge eines Substrats mit zunehmender Bindungsaffinität des Inhibitors abnimmt. Im Hinblick auf die medizinische Anwendung werden daher Inhibitoren bevorzugt, deren Bindungsaffinität so groß ist, daß diese als Wirkstoff im Rahmen einer wirksamen medizinischen Behandlung in vertretbaren Mengen verabreicht werden können. Erfindungsgemäße Inhibitoren werden daher vorzugsweise in Tagesdosen von etwa 0,01 bis 30 mg/kg Körpergewicht und insbesondere von etwa 0,1 bis 15 mg/kg Körpergewicht verabreicht.

Eine Möglichkeit, die Bindungsaffinität auszudrücken, bieten die oben angesprochenen Kompetitionsexperimente, mit denen man diejenige Konzentration an Inhibitor ermittelt, die das Enzym im Hinblick auf die Umsetzung eines anderen Substrats zu 50% hemmt (IC_{50} -Werte). So läßt sich auch die kompetitive Hemmung der Bindung von Heparanase-Inhibitoren dahingehend auswerten, daß erfindungsgemäß bevorzugte Inhibitoren halbmaximale Hemmkonstanten IC_{50} in vitro von weniger als 10^{-3} M, vorzugsweise von weniger als 10^{-4} M und insbesondere von weniger als 10^{-5} M und bei nicht-kompetitiver Hemmung von weniger als 10^{-4} M, vorzugsweise von weniger als 10^{-5} M und insbesondere von weniger als 10^{-6} M aufweisen.

Bei den Expressionsinhibitoren handelt es sich insbesondere um Oligonukleotide, die beispielsweise im Sinne einer antisense-RNA oder -DNA, oder im Sinne der Triple-Helix-Technik wirken.

Eine Reihe von Heparanase-Inhibitoren sind bereits bekannt. Es handelt sich vielfach um Glycosaminoglykane mit struktureller Ähnlichkeit zu den natürlichen Substraten der Heparanase, insbesondere Heparansulfate. Hierzu gehören Heparine, Heparinfraktio-

7

nen und Heparinfragmente, z.B. Heparine bestimmten Molekulargewichts, Heparinderivate, beispielsweise Heparine mit zumindest teilweise reduzierten Carboxylgruppen, zumindest partiell N-desulfatierte, N-acetylierte Heparine, z.B. in EP 0 254 067 A2, WO 5 92/01003 und US-A-5,206,223 beschriebenes N-desulfatiertes, N-acetyliertes Heparin, zumindest partiell N,O-desulfatierte, N-resulfatierte Heparine, z.B. die in WO 92/01003 und US-A-5,206,223 beschriebenen Verbindungen, und O-acylierte Heparine, beispielsweise die in der EP 0 356 275 A1 beschriebenen 10 Verbindungen.

Heparin wird vorzugsweise aus natürlichen Quellen, beispielsweise der intestinalen Mukosa von Rindern oder Schweinen, gewonnen. Eine Fragmentierung und/oder Fraktionierung kann auf die übliche 15 Art und Weise erfolgen. Carboxylgruppen lassen sich beispielsweise mit NaBH_4 reduzieren. Sulfatgruppen können beispielsweise durch eine Behandlung mit wasser- oder methanolhaltigem DMSO entfernt werden, wobei sich der Grad der Desulfatierung nach der Reaktionsdauer, der Reaktionstemperatur und dem Zusatz von Wasser 20 oder Methanol richtet. Eine N-Acetylierung kann beispielsweise mit Essigsäureanhydrid unter alkalischen Bedingungen bewerkstelligt werden und die Resulfatierung gelingt beispielsweise mit einem Triethylamin-Schwefeltrioxid-Komplex.

25 Anstatt Heparin können auch andere Glycosaminoglykane derivatisiert werden, beispielsweise Hyaluronsäure, Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Heparansulfat und deren Proteoglykane, wie am Beispiel der O-Acylierung in der EP 0 356 275 A1 beschrieben ist.

30 Geeignet sind auch sulfatierte Oligosaccharide, beispielsweise die in WO 96/33726 beschriebenen, also insbesondere sulfatierte Mannopentaosephosphate, Maltohexaosesulfate und dergleichen, und sulfatierte Polysaccharide, beispielsweise die in WO 88/05301 beschrieben, also insbesondere Heparin, Fucoidan, Pentosansulfat, 35 Dextransulfat und Carrageenan-Lambda. Auch die in WO 90/01938 genannten Phosphozucker enthaltenden Oligo- und Polysaccharide sind brauchbar.

40 Ebenfalls geeignet sind glycomimetische Saccharopeptide, beispielsweise die in WO 96/35700 beschriebenen der Formel



45 worin

8

die Reste W unabhängig voneinander für Fucose,
 3-Amino-3-deoxyglucose, 4-Amino-4-deoxyglucose, Glucose,
 Galactose, Glucosamin, Galactosamin, Glucuronsäure,
 Galacturonsäure, Glucosaminuronsäure, Neuraminsäure, Maltose,
 5 Maltotriose, Iduronsäure, 2,5-Anhydromannitol, Mannose,
 Mannuronsäure, und Cellobiose stehen;

die Reste Y unabhängig voneinander für $-NR^3-C(O)-$ und $-C(O)-NR^3-$
 stehen;

10

die Reste X unabhängig voneinander für eine difunktionelle or
 polyfunktionelle Gruppe, insbesondere Ethylenglycol,
 Ethylenglycol-Oligomere, Niedrigalkyl, gegebenenfalls
 substituiertes Alkyl, Aminosäuren und Peptide stehen;

15

n jeweils 0 oder 1 ist;

m jeweils 0 oder eine ganze Zahl von 1 bis 99 ist;

mit der Maßgabe, daß die Gesamtanzahl von Resten W 2 bis 100 be-
 20 trägt;

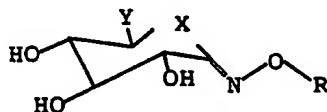
und R^3 für -H, Alkyl mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und Aralkyl mit
 5 bis 8 Kohlenstoffatomen steht.

25 Laminarin-Sulfate, auch Laminaran-Sulfate genannt, das sind li-
 neare Polymere aus β -1,3-verknüpften Glucose-Resten mit gegebene-
 nenfalls geringen Anteilen an β -(1,6)-Verknüpfungen und 2 bis 3%
 D-Mannitol-Endgruppen, insbesondere das Natriumsalz mit einem mo-
 laren Verhältnis von wenigstens 1:1 Sulfatgruppen zu Monosaccha-
 30 rid-Einheiten ist ebenfalls als Heparanase-Inhibitor brauchbar
 (vgl. WO 95/24907).

Weitere Heparanase-Inhibitoren sind Suramin und Trachyspensäure.

35 Geeignet sind auch die in dem US-Patent 5,817,800 beschriebenen
 Verbindungen der Formel I

40



45 worin

9

Y für $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OH})$, $-\text{P}(\text{O})\text{R}^6(\text{OH})$, Tetrazol und $-\text{SO}_3\text{H}$ steht, worin

R^6 C_1-C_4 -Alkyl ist,

5

X für NH, O oder S steht, und

R für ein Wasserstoffatom oder für $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}_6(\text{R}^7)_5$ steht, worin $\text{C}_6(\text{R}^7)_5$ vorzugsweise für gegebenenfalls einfach bis fünffach substituiertes Phenyl steht und die Substituenten R^7 ausgewählt sind unter OH, Halogen, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$ oder $-\text{SO}_3\text{H}$.

10

Auch die Salze dieser Verbindungen gehören dazu. Veranschaulichende Beispiele dieser Verbindungen sind (Z)-O-(D-Glukopyranuronosyliden)amino-N-phenylcarbamate und (5R,Z)-O-(5-C-Phosphonato-D-xylopyranosyliden)amino-N-phenylcarbamate bzw. deren Natriumsalze. Diese Verbindungen können in an sich bekannter Weise hergestellt werden, beispielsweise mit den in der EP 0 642 799 beschriebenen Verfahren.

20

Niedermolekulare Heparanase-Inhibitoren, meist synthetische Verbindungen, sind in vielerlei Hinsicht vorteilhaft brauchbar.

Auch Aptamere, das sind Nukleinsäuren, in der Regel Oligonukleotide, mit ausreichender Affinität zu Heparanase, können als Inhibitoren Anwendung finden.

Auch Heparanase-spezifische Antikörper können als Heparanase-Inhibitoren brauchbar sein. Es kann sich um polyklonale Antisera, monoklonale Antikörper, Antikörperfragmente, wie F(ab), Fc, etc., chimäre, humanisierte und rekombinante Antikörper handeln. Die Herstellung solcher Antikörper kann in an sich bekannter Weise erfolgen. Als Immunogen kann man Heparanase als solche oder antigene Fragmente davon, die in der Regel an übliche Trägerproteine gekoppelt werden, verwenden. In Beispiel 8 der WO 99/43830 wird beispielsweise die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen ausgesuchte Peptide humaner Heparanase beschrieben. In ähnlicher Weise wird in WO 95/04158 die Herstellung ausgesuchter Heparanase-Peptide, insbesondere einer C-terminalen Sequenz, dort SEQ ID NO:42 genannt, und die Erzeugung hiergegen gerichteter Antisera sowie deren Brauchbarkeit als Heparanase-Inhibitoren beschrieben.

Die WO 96/08559 beschreibt Phosphorthioat- oder Phosphordithioat-Antisense-Oligonukleotide mit vorzugsweise 7 bis 30 Nukleotiden, die im wesentlichen aus dG und/oder dT-Nukleotiden gebildet werden. Konkret eignen sich zur Inhibition von Endoglycosidasen,

45

10

insbesondere Heparanasen, beispielsweise die Oligonukleotide der dort beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO:2,4,6,10.

Die erfindungsgemäße Anwendung ist nicht auf die vorstehend genannten Inhibitoren beschränkt. Vielmehr kann jede Substanz, in deren Gegenwart die Heparanase-Aktivität geringer ist als in deren Abwesenheit, erfindungsgemäß als Heparanase-Inhibitor Anwendung finden.

- 10 Zur Messung der Heparanase-Aktivität sind Testsysteme bekannt. Diese beruhen in der Regel auf dem Einsatz von markierten Heparansulfaten oder Heparansulfat-Proteoglykanen als Substrat, wobei die Umsetzung, d.h. die Spaltung dieses Substrats und die damit verbundene Freisetzung bestimmter Fragmente anhand der Markierung
15 verfolgt werden kann. Beispielsweise kann man fluoreszenz-, z.B. FITC-, oder radio-, z.B. $^{35}\text{SO}_4$ -, ^{14}C - oder ^3H -markierte Heparansulfate oder Heparansulfat-Proteoglykane, insbesondere $^{35}\text{SO}_4$ -markierte Heparansulfat-Proteoglykane, ^{14}C - oder ^3H -acetylierte Heparansulfate, oder fluoreszenzmarkierte Substrate, beispielsweise
20 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid verwenden.

- Die Substrate können auf biologischem Wege erhalten werden, beispielsweise indem man Endothelialzellen in radiomarkiertem $^{35}\text{SO}_4$ kultiviert oder tumorösen Versuchstieren radiomarkiertes Sulfat
25 injiziert, und aus den Endothelial- bzw. Tumorzellen entsprechend markierte Heparansulfat-Proteoglykane gewinnt. Die Substrate können aber auch auf chemischem Wege synthetisiert werden, beispielsweise indem man Heparansulfat zunächst partiell deacetyliert und anschließend reacetyliert. Durch reduktive Aminierung
30 der freien Enden von Heparansulfat und anschließender Anfügung geeigneter Markierungen können beispielsweise fluoreszenzmarkierte Heparansulfate hergestellt werden. Es kann von Vorteil sein, solche Substrate an einen festen Träger zu koppeln, was den Nachweis freigesetzter Fragmente erleichtert. Zu diesem Zweck
35 kann man die in diesem Bereich übliche Kopplungschemie anwenden, beispielsweise zunächst die reduzierenden Enden aminieren und dann derart modifizierte Glycosaminoglykane an geeignete Matrices, beispielsweise Agarose, Sepharose und ähnliches koppeln. Heparansulfat-Proteoglykane oder auch Heparansulfat-Peptide davon
40 können beispielsweise an CNBr-aktivierter Sepharose gekoppelt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Abtrennung der Degradationsprodukte durch Gelfiltration, Fällungsreaktionen, z.B. wie in Beispiel J der WO 96/35700 beschrieben ist, und ähnlichem. Mittels HPLC, vorzugsweise der Ausfluß-HPLC, lassen sich
45 vorteilhafterweise Fluoreszenzmarkierungen detektieren. Gemäß dem in der WO 98/03638 beschriebenen Testverfahren kann man auch HS-bindende Proteine, z.B. histidinreiche Glycoproteine, vorzugs-

11

weise in immobilisierter Form verwenden, um nicht oder nur partiell degradiertes Heparanase-Substrat von degradiertem Substrat zu trennen und dadurch dessen Nachweis zu ermöglichen.

- 5 Die in diesen Tests eingesetzte Heparanase kann natürlichen oder rekombinanten Ursprungs sein, so kann Heparanase aus einer Vielzahl von Geweben und Körperflüssigkeiten, Serum eingeschlossen, aufgereinigt werden. Die Expression menschlicher Heparanase kann mit den in WO 95/04158 und WO 99/43830 erwähnten Expressionssystemen bewerkstelligt werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Identifizierung von Heparanase-Inhibitoren, wobei man die Aktivität von Heparanase in Gegenwart und in Abwesenheit wenigstens einer Testsubstanz bestimmt.

- Die vorstehend beschriebenen und weitere in ähnlicher Weise geeignete Testsysteme können die Grundlage bilden für in vitro-Screening-Verfahren, vorzugsweise zum primären Screening, mit denen man aus einer Vielzahl verschiedener Substanzen diejenigen auslesen kann, die im Hinblick auf die erfindungsgemäße Anwendung brauchbar sind. So betrifft die vorliegende Erfindung auch entsprechende Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen zur Behandlung von Herzinsuffizienz und darauf aufbauend die Herstellung pharmazeutischer Mittel zur Behandlung von Herzinsuffizienz. Ein solches Verfahren zur Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von Herzinsuffizienz ist dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst aus einer Vielzahl von Substanzen Heparanase-Inhibitoren auswählt und diese zur Herstellung des Mittels verwendet. Bei spielsweise können mittels kombinatorischer Chemie umfangreiche Stoffbanken angelegt werden, die Myriaden potentieller Wirkstoffe umfassen. Das Durchmustern kombinatorischer Substanzbibliotheken nach Stoffen mit gewünschter Aktivität ist automatisierbar. Screening-Roboter dienen der effizienten Auswertung der vorzugsweise auf Mikrotiterplatten angeordneten Einzelassays.

- Eine besonders effektive Technologie zur Durchführung derartiger Verfahren ist der im Bereich des Wirkstoffscreenings bekannte Scintillation Proximity Assay, kurz SPA genannt. Kits und Komponenten zur Durchführung dieses Assays können kommerziell bezogen werden, beispielsweise bei Amersham Pharmacia Biotech. Für enzymatische Testanwendungen werden im Prinzip solubilisierete oder membrangebundene Substrate auf Scintillationssubstanz enthaltenden, kleinen Fluomikrosphären immobilisiert. Je nach Art der zu testenden enzymatischen Aktivität ist das Substrat radioaktiv markiert und die Scintillationssubstanz wird solange zur Lichtemission angeregt, wie die räumliche Nähe zwischen Scintillations-

12

substanz und Radiomarkierung gegeben ist, oder es wird die radioaktive Markierung in das immobilisierte Substrat eben durch die zu messende Enzymaktivität eingefügt und als Folge die Scintillationssubstanz zur Lichtemission angeregt. So ergeben sich Testfor-
5 mate, bei denen eine abnehmende bzw. zunehmende Signalintensität gemessen wird.

Eine weitere besonders effektive Technologie zur Durchführung derartiger Verfahren ist die im Bereich des Wirkstoffscreenings
10 bekannte FlashPlate®-Technologie. Kits und Komponenten zur Durchführung dieses Assays können kommerziell bezogen werden, beispielsweise bei NEN® Life Science Products. Dieses Prinzip basiert ebenfalls auf Mikrotiterplatten (96er oder 384er), die mit Scintillationssubstanz beschichtet sind.

15 Die erfindungsgemäße Verwendung von Heparanase-Inhibitoren beinhaltet im Rahmen der Behandlung ein Verfahren. Dabei wird dem zu behandelnden Individuum, vorzugsweise einem Säuger, insbesondere einem Menschen, Nutz- oder Haustier, eine wirksame Menge eines
20 oder mehrerer Heparanase-Inhibitoren, in der Regel der pharmazeutischen und tierarzneilichen Praxis entsprechend formuliert, verabreicht. Die Behandlung erfolgt in der Regel durch einmaliges oder mehrmaliges tägliches Zuführen gegebenenfalls zusammen oder im Wechsel mit anderen Wirkstoffen oder wirkstoffhaltigen Präpa-
25 raten. Ob eine solche Behandlung angezeigt ist und in welcher Form sie zu erfolgen hat, hängt vom Einzelfall ab und unterliegt einer medizinischen Beurteilung (Diagnose), die vorhandene Anzeichen, Symptome und/oder Fehlfunktionen, Risiken, bestimmte Anzeichen, Symptome und/oder Fehlfunktionen zu entwickeln, und weitere
30 Faktoren miteinbezieht.

Die erfindungsgemäße Lehre richtet sich vor allem auf die Herstellung pharmazeutischer Mittel zur Behandlung eines Individuums, vorzugsweise eines Säugers, insbesondere eines Menschen,
35 Nutz- oder Haustieres. So werden die Inhibitoren gewöhnlich in Form von pharmazeutischen Zusammensetzungen verabreicht, die einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Inhibitor, gegebenenfalls auch einem Gemisch mehrerer erfindungsgemäßer Inhibitoren, und gegebenenfalls weiteren
40 Wirkstoffen umfassen. Diese Zusammensetzungen können beispielsweise auf oralem, rektalem, transdermale, subkutanem, intravenösem, intramuskulärem oder intranasalem Weg verabreicht werden.

Beispiele geeigneter pharmazeutischer Formulierungen sind feste
45 Arzneiformen, wie Pulver, Puder, Granulate, Tabletten, Pastillen, Sachets, Cachets, Dragees, Kapseln wie Hart- und Weichgelatine-kapseln, Suppositorien oder vaginale Arzneiformen, halb feste Arz-

13

neiformen, wie Salben, Cremes, Hydrogele, Pasten oder Pflaster, sowie flüssige Arzneiformen, wie Lösungen, Emulsionen, insbesondere Öl-in-Wasser-Emulsionen, Suspensionen, beispielsweise Lotionen, Injektions- und Infusionszubereitungen, Augen- und Ohrentropfen. Auch implantierte Abgabevorrichtungen können zur Verabreichung erfindungsgemäßer Inhibitoren verwendet werden. Ferner können auch Liposomen, Mikrosphären oder Polymermatrizes zur Anwendung kommen.

10 Bei der Herstellung der Zusammensetzungen werden erfindungsgemäße Inhibitoren gewöhnlich mit einem Exzipienten vermischt oder verdünnt. Exzipienten können feste, halbfeste oder flüssige Materialien sein, die als Vehikel, Träger oder Medium für den Wirkstoff dienen.

15

Zu geeigneten Exzipienten gehören beispielsweise Lactose, Dextrose, Sucrose, Sorbitol, Mannitol, Stärken, Akaziengummi, Calciumphosphat, Alginate, Traganth, Gelatine, Calciumsilikat, mikrokristalline Cellulose, Polyvinylpyrrolidon, Cellulose, Wasser,

20 Sirup und Methylcellulose. Ferner können die Formulierungen pharmazeutisch akzeptable Träger oder übliche Hilfsstoffe, wie Gleitmittel, beispielsweise Talk, Magnesiumstearat und Mineralöl; Netzmittel; emulgierende und suspendierende Mittel; konservierende Mittel, wie Methyl- und Propylhydroxybenzoate; Antioxidan-

25 tien; Antireizstoffe; Chelatbildner; Dragierhilfsmittel; Emulsionsstabilisatoren; Filmbildner; Gelbildner; Geruchsmaskierungsmittel; Geschmackskorrigentien; Harze; Hydrokolloide; Lösemittel; Lösungsvermittler; Neutralisierungsmittel; Permeationsbeschleuniger; Pigmente; quaternäre Ammoniumverbindungen; Rückfettungs- und Überfettungsmittel; Salben-, Creme- oder Öl-Grundstoffe; Silikon-Derivate; Spreithilfsmittel; Stabilisatoren; Sterilanzen; Suppositoriengrundlagen; Tabletten-Hilfsstoffe, wie Bindemittel, Füllstoffe, Gleitmittel, Sprengmittel oder Überzüge; Treibmittel; Trocknungsmittel; Trübungsmittel; Verdickungsmittel; Wachse;

35 Weichmacher; Weißöle umfassen. Eine diesbezügliche Ausgestaltung beruht auf fachmännischem Wissen, wie beispielsweise in Fiedler, H.P., Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, 4. Auflage, Aulendorf: ECV-Editio-Cantor-Verlag, 1996, dargestellt ist.

40

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert, ohne darauf beschränkt zu sein.

Figur 1 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der nach RT-PCR gemäß Beispiel 1 erhaltenen Amplifikate parallel zu Molekulargewichtsstandards (MWM) und der Negativ-Kontrolle (negativ).

14

Beispiel 1

Heparanase-Expression in einem Ratten-Modell für kongestive Herzinsuffizienz

5

Das verwendete Tier-Modell wurde von Wiesener et al. in Circulation 95, 1253-1259 (1997) beschrieben. So entwickelten fünf mit der Aortenklammertechnik behandelte Ratten (Nr. 3, 15, 24, 25, 112) eine kongestive Herzinsuffizienz (Herzhypertrophie). Die Herzen wurden entnommen, und die mRNA wurde in üblicher Weise isoliert. Mittels RT-PCR konnte die Menge an exprimierter Heparanase-mRNA bestimmt werden, indem man als Sense-Primer das Oligonukleotid mit der Sequenz SEQ ID NO:3 und als Antisense-Primer das Oligonukleotid mit der Sequenz SEQ ID NO:4 verwendete. Parallel wurde die GAPDH-Expression als Housekeeping-Gen gemessen. Die gleiche Untersuchung wurde an Kontrolltieren (Ratten Nr. 11, 17, 19, 32, 33) vorgenommen.

Die jeweiligen mittels RT-PCR erhaltenen Amplifikate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, und ihre Menge wurde quantifiziert. Fig. 1 zeigt für die Tiere 11, 17, 19, 32 und 33 der Kontrollgruppe sowie die Tiere 3, 15, 24, 25 und 112 der Testgruppe die erhaltenen Amplifikate nach elektrophoretischer Auftrennung. Die Quantifizierung ergab folgende, jeweils auf die GAPDH-Expression bezogene Heparanase-mRNA-Spiegel:

Tabelle 1:

| | | | |
|----|----------------|----------|-----------------|
| 30 | | Tier Nr. | mRNA-Expression |
| | Kontrollgruppe | 11 | 5,117 |
| | | 17 | 5,077 |
| 35 | | 19 | 4,65 |
| | | 32 | 3,812 |
| | | 33 | 3,474 |
| | Testgruppe | 3 | 4,205 |
| 40 | | 15 | 4,223 |
| | | 24 | 4,14 |
| | | 25 | 4,102 |
| 45 | | 112 | 4,093 |

15

Als Mittelwerte ergeben sich für die Kontrollgruppe $4,289 \pm 0.75$ und für die Testgruppe $4,153 \pm 0,06$. Diese Werte zeigen, daß der im Modell induzierte pathologische Zustand nicht mit einer Regulation der Expression von Heparanase-mRNA verbunden ist, sondern
5 die im Zusammenhang mit Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz auftretende intra- und extrazelluläre Ansäuerung die Heparanase-Aktivität moduliert (Schini-Kerth et al (1997) Circulation 96, 3888-3896; Shrode et al. (1997) J Bioenerg Biomembr 29, 393-399; Kraus and Wolf (1996) Tumor Biol 17, 133-154; Tamagaki et al.
10 (1996) Atherosclerosis 123, 73-82; Brown and Breton (1996) J Exp Biol. 199, 2345-2358; Apkon et al. (1997) Am J Physiol 273, H434-445; Ito et al (1997) J. Clin Invest 99, 125-135; Tajima et al. (1998) Circulation 98, 2760-2764; Flores et al (1996) Kidney Int. Suppl 55, S122 125; Hisatome et al. (1997) Gen Pharmacol 29,
15 557-560; Russ et al. (1996) Pflugers Arch 433, 26-34).

20

25

30

35

40

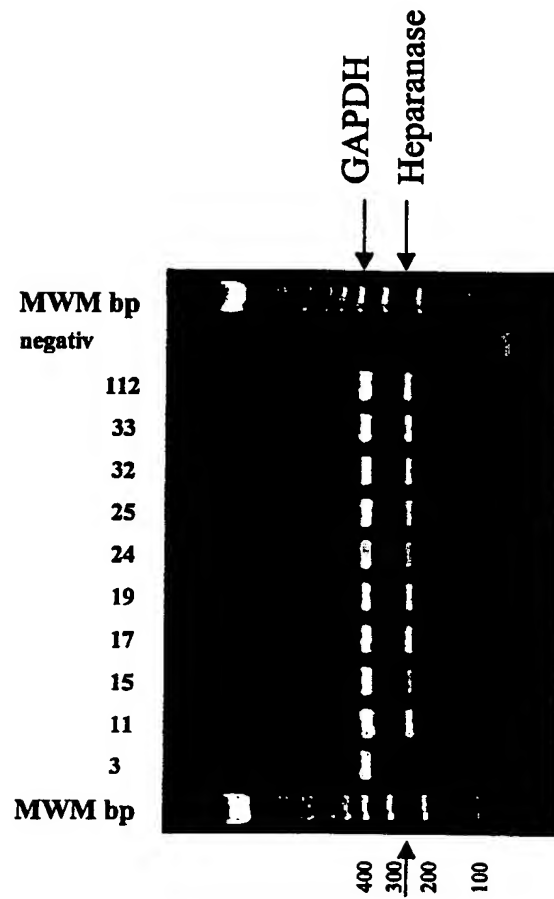
45

Patentansprüche

1. Verwendung wenigstens eines Heparanase-Inhibitors zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Behandlung von Herzinsuffizienz und damit zusammenhängenden Anzeichen, Symptomen und/oder Fehlfunktionen.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung von kongestiver Herzinsuffizienz und damit zusammenhängenden Anzeichen, Symptomen und/oder Fehlfunktionen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2 zur Behandlung von peripheren Ödemen, Lungen- und Leberkongestion, Dyspnoe, Brust- und Bauchwassersucht.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei wenigstens ein Heparanase-Inhibitor ein Glycosaminoglykan ist.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Glycosaminoglykan ausgewählt ist unter Heparinen mit zumindest teilweise reduzierten Carboxylgruppen, zumindest partiell N-desulfatierten, N-acetylierten Heparinen, zumindest partiell N,O-desulfatierten, N-resulfatierten Heparinen, O-acylierten Heparinen, sulfatierten und/oder phosphorylierten Oligosacchariden, glycomimetischen Saccharopeptiden, Laminarin-Sulfaten, Suramin und Trachyspinsäure.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei wenigstens ein Heparanase-Inhibitor eine niedermolekulare Verbindung ist.
7. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Behandlung von Herzinsuffizienz, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst aus einer Vielzahl von Substanzen Heparanase-Inhibitoren auswählt und diese zur Herstellung des Mittels verwendet.

1/1

FIGUR 1



SEQUENCE LISTING

<110> Knoll AG

<120> HEPARANASE INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF
HEART FAILURE

<130> M/40261

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1724

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (52)..(1683)

<400> 1

```

aggcggggccg ctgcgcggca gctggcgggg gagcagccag gtgagcccaa g atg ctg 57
                                         Met Leu
                                         1

ctg cgc tcg aag cct gcg ctg ccg ccg ccg ctg atg ctg ctg ctc ctg 105
Leu Arg Ser Lys Pro Ala Leu Pro Pro Pro Leu Met Leu Leu Leu
      5              10              15

ggg ccg ctg ggt ccc ctc tcc cct ggt gcc ctg ccc cga cct gcg caa 153
Gly Pro Leu Gly Pro Leu Ser Pro Gly Ala Leu Pro Arg Pro Ala Gln
      20              25              30

gca cag gac gtc gtg gac ctg gac ttc ttc acc cag gag ccg ctg cac 201
Ala Gln Asp Val Val Asp Leu Asp Phe Phe Thr Gln Glu Pro Leu His
      35              40              45              50

ctg gtg agc ccc tcg ttc ctg tcc gtc acc att gac gcc aac ctg gcc 249
Leu Val Ser Pro Ser Phe Leu Ser Val Thr Ile Asp Ala Asn Leu Ala
      55              60              65

acg gac ccg cgg ttc ctc atc ctc ctg ggt tct cca aag ctt cgt acc 297
Thr Asp Pro Arg Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ser Pro Lys Leu Arg Thr
      70              75              80

```

| | |
|---|-----|
| ttg gcc aga ggc ttg tct cct gcg tac ctg agg ttt ggt ggc acc aag | 345 |
| Leu Ala Arg Gly Leu Ser Pro Ala Tyr Leu Arg Phe Gly Gly Thr Lys | |
| 85 90 95 | |
| aca gac ttc cta att ttc gat ccc aag aag gaa tca acc ttt gaa gag | 393 |
| Thr Asp Phe Leu Ile Phe Asp Pro Lys Lys Glu Ser Thr Phe Glu Glu | |
| 100 105 110 | |
| aga agt tac tgg caa tct caa gtc aac cag gat att tgc aaa tat gga | 441 |
| Arg Ser Tyr Trp Gln Ser Gln Val Asn Gln Asp Ile Cys Lys Tyr Gly | |
| 115 120 125 130 | |
| tcc atc cct cct gat gtg gag gag aag tta cgg ttg gaa tgg ccc tac | 489 |
| Ser Ile Pro Pro Asp Val Glu Glu Lys Leu Arg Leu Glu Trp Pro Tyr | |
| 135 140 145 | |
| cag gag caa ttg cta ctc cga gaa cac tac cag aaa aag ttc aag aac | 537 |
| Gln Glu Gln Leu Leu Leu Arg Glu His Tyr Gln Lys Lys Phe Lys Asn | |
| 150 155 160 | |
| agc acc tac tca aga agc tct gta gat gtg cta tac act ttt gca aac | 585 |
| Ser Thr Tyr Ser Arg Ser Ser Val Asp Val Leu Tyr Thr Phe Ala Asn | |
| 165 170 175 | |
| tgc tca gga ctg gac ttg atc ttt ggc cta aat gcg tta tta aga aca | 633 |
| Cys Ser Gly Leu Asp Leu Ile Phe Gly Leu Asn Ala Leu Leu Arg Thr | |
| 180 185 190 | |
| gca gat ttg cag tgg aac agt tct aat gct cag ttg ctc ctg gac tac | 681 |
| Ala Asp Leu Gln Trp Asn Ser Ser Asn Ala Gln Leu Leu Leu Asp Tyr | |
| 195 200 205 210 | |
| tgc tct tcc aag ggg tat aac att tct tgg gaa cta ggc aat gaa cct | 729 |
| Cys Ser Ser Lys Gly Tyr Asn Ile Ser Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro | |
| 215 220 225 | |
| aac agt ttc ctt aag aag gct gat att ttc atc aat ggg tcg cag tta | 777 |
| Asn Ser Phe Leu Lys Lys Ala Asp Ile Phe Ile Asn Gly Ser Gln Leu | |
| 230 235 240 | |
| gga gaa gat ttt att caa ttg cat aaa ctt cta aga aag tcc acc ttc | 825 |
| Gly Glu Asp Phe Ile Gln Leu His Lys Leu Leu Arg Lys Ser Thr Phe | |
| 245 250 255 | |
| aaa aat gca aaa ctc tat ggt cct gat gtt ggt cag cct cga aga aag | 873 |
| Lys Asn Ala Lys Leu Tyr Gly Pro Asp Val Gly Gln Pro Arg Arg Lys | |
| 260 265 270 | |
| acg gct aag atg ctg aag agc ttc ctg aag gct ggt gga gaa gtg att | 921 |
| Thr Ala Lys Met Leu Lys Ser Phe Leu Lys Ala Gly Gly Glu Val Ile | |
| 275 280 285 290 | |

3

| | |
|---|------|
| gat tca gtt aca tgg cat cac tac tat ttg aat gga cgg act gct acc | 969 |
| Asp Ser Val Thr Trp His His Tyr Tyr Leu Asn Gly Arg Thr Ala Thr | |
| 295 300 305 | |
| agg gaa gat ttt cta aac cct gat gta ttg gac att ttt att tca tct | 1017 |
| Arg Glu Asp Phe Leu Asn Pro Asp Val Leu Asp Ile Phe Ile Ser Ser | |
| 310 315 320 | |
| gtg caa aaa gtt ttc cag gtg gtt gag agc acc agg cct ggc aag aag | 1065 |
| Val Gln Lys Val Phe Gln Val Val Glu Ser Thr Arg Pro Gly Lys Lys | |
| 325 330 335 | |
| gtc tgg tta gga gaa aca agc tct gca tat gga ggc gga gcg ccc ttg | 1113 |
| Val Trp Leu Gly Glu Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Gly Gly Ala Pro Leu | |
| 340 345 350 | |
| cta tcc gac acc ttt gca gct ggc ttt atg tgg ctg gat aaa ttg ggc | 1161 |
| Leu Ser Asp Thr Phe Ala Ala Gly Phe Met Trp Leu Asp Lys Leu Gly | |
| 355 360 365 370 | |
| ctg tca gcc cga atg gga ata gaa gtg gtg atg agg caa gta ttc ttt | 1209 |
| Leu Ser Ala Arg Met Gly Ile Glu Val Val Met Arg Gln Val Phe Phe | |
| 375 380 385 | |
| gga gca gga aac tac cat tta gtg gat gaa aac ttc gat cct tta cct | 1257 |
| Gly Ala Gly Asn Tyr His Leu Val Asp Glu Asn Phe Asp Pro Leu Pro | |
| 390 395 400 | |
| gat tat tgg cta tct ctt ctg ttc aag aaa ttg gtg ggc acc aag gtg | 1305 |
| Asp Tyr Trp Leu Ser Leu Leu Phe Lys Lys Leu Val Gly Thr Lys Val | |
| 405 410 415 | |
| tta atg gca agc gtg caa ggt tca aag aga agg aag ctt cga gta tac | 1353 |
| Leu Met Ala Ser Val Gln Gly Ser Lys Arg Arg Lys Leu Arg Val Tyr | |
| 420 425 430 | |
| ctt cat tgc aca aac act gac aat cca agg tat aaa gaa gga gat tta | 1401 |
| Leu His Cys Thr Asn Thr Asp Asn Pro Arg Tyr Lys Glu Gly Asp Leu | |
| 435 440 445 450 | |
| act ctg tat gcc ata aac ctc cat aat gtc acc aag tac ttg cgg tta | 1449 |
| Thr Leu Tyr Ala Ile Asn Leu His Asn Val Thr Lys Tyr Leu Arg Leu | |
| 455 460 465 | |
| ccc tat cct ttt tct aac aag caa gtg gat aaa tac ctt cta aga cct | 1497 |
| Pro Tyr Pro Phe Ser Asn Lys Gln Val Asp Lys Tyr Leu Leu Arg Pro | |
| 470 475 480 | |
| ttg gga cct cat gga tta ctt tcc aaa tct gtc caa ctc aat ggt cta | 1545 |
| Leu Gly Pro His Gly Leu Leu Ser Lys Ser Val Gln Leu Asn Gly Leu | |
| 485 490 495 | |

4

act cta aag atg gtg gat gat caa acc ttg cca cct tta atg gaa aaa 1593
 Thr Leu Lys Met Val Asp Asp Gln Thr Leu Pro Pro Leu Met Glu Lys
 500 505 510

cct ctc cgg cca gga agt tca ctg ggc ttg cca gct ttc tca tat agt 1641
 Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Gly Leu Pro Ala Phe Ser Tyr Ser
 515 520 525 530

ttt ttt gtg ata aga aat gcc aaa gtt gct gct tgc atc tga 1683
 Phe Phe Val Ile Arg Asn Ala Lys Val Ala Ala Cys Ile
 535 540

aaataaaata tactagtcct gaaaaaaaaa a 1724

<210> 2

<211> 543

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Leu Arg Ser Lys Pro Ala Leu Pro Pro Pro Leu Met Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Pro Leu Gly Pro Leu Ser Pro Gly Ala Leu Pro Arg Pro
 20 25 30

Ala Gln Ala Gln Asp Val Val Asp Leu Asp Phe Phe Thr Gln Glu Pro
 35 40 45

Leu His Leu Val Ser Pro Ser Phe Leu Ser Val Thr Ile Asp Ala Asn
 50 55 60

Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ser Pro Lys Leu
 65 70 75 80

Arg Thr Leu Ala Arg Gly Leu Ser Pro Ala Tyr Leu Arg Phe Gly Gly
 85 90 95

Thr Lys Thr Asp Phe Leu Ile Phe Asp Pro Lys Lys Glu Ser Thr Phe
 100 105 110

Glu Glu Arg Ser Tyr Trp Gln Ser Gln Val Asn Gln Asp Ile Cys Lys
 115 120 125

Tyr Gly Ser Ile Pro Pro Asp Val Glu Glu Lys Leu Arg Leu Glu Trp
 130 135 140

Pro Tyr Gln Glu Gln Leu Leu Leu Arg Glu His Tyr Gln Lys Lys Phe
 145 150 155 160

Lys Asn Ser Thr Tyr Ser Arg Ser Ser Val Asp Val Leu Tyr Thr Phe
 165 170 175

5

Ala Asn Cys Ser Gly Leu Asp Leu Ile Phe Gly Leu Asn Ala Leu Leu
 180 185 190

Arg Thr Ala Asp Leu Gln Trp Asn Ser Ser Asn Ala Gln Leu Leu Leu
 195 200 205

Asp Tyr Cys Ser Ser Lys Gly Tyr Asn Ile Ser Trp Glu Leu Gly Asn
 210 215 220

Glu Pro Asn Ser Phe Leu Lys Lys Ala Asp Ile Phe Ile Asn Gly Ser
 225 230 235 240

Gln Leu Gly Glu Asp Phe Ile Gln Leu His Lys Leu Leu Arg Lys Ser
 245 250 255

Thr Phe Lys Asn Ala Lys Leu Tyr Gly Pro Asp Val Gly Gln Pro Arg
 260 265 270

Arg Lys Thr Ala Lys Met Leu Lys Ser Phe Leu Lys Ala Gly Gly Glu
 275 280 285

Val Ile Asp Ser Val Thr Trp His His Tyr Tyr Leu Asn Gly Arg Thr
 290 295 300

Ala Thr Arg Glu Asp Phe Leu Asn Pro Asp Val Leu Asp Ile Phe Ile
 305 310 315 320

Ser Ser Val Gln Lys Val Phe Gln Val Val Glu Ser Thr Arg Pro Gly
 325 330 335

Lys Lys Val Trp Leu Gly Glu Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Gly Gly Ala
 340 345 350

Pro Leu Leu Ser Asp Thr Phe Ala Ala Gly Phe Met Trp Leu Asp Lys
 355 360 365

Leu Gly Leu Ser Ala Arg Met Gly Ile Glu Val Val Met Arg Gln Val
 370 375 380

Phe Phe Gly Ala Gly Asn Tyr His Leu Val Asp Glu Asn Phe Asp Pro
 385 390 395 400

Leu Pro Asp Tyr Trp Leu Ser Leu Leu Phe Lys Lys Leu Val Gly Thr
 405 410 415

Lys Val Leu Met Ala Ser Val Gln Gly Ser Lys Arg Arg Lys Leu Arg
 420 425 430

Val Tyr Leu His Cys Thr Asn Thr Asp Asn Pro Arg Tyr Lys Glu Gly
 435 440 445

Asp Leu Thr Leu Tyr Ala Ile Asn Leu His Asn Val Thr Lys Tyr Leu
 450 455 460

6

Arg Leu Pro Tyr Pro Phe Ser Asn Lys Gln Val Asp Lys Tyr Leu Leu
465 470 475 480

Arg Pro Leu Gly Pro His Gly Leu Leu Ser Lys Ser Val Gln Leu Asn
485 490 495

Gly Leu Thr Leu Lys Met Val Asp Asp Gln Thr Leu Pro Pro Leu Met
500 505 510

Glu Lys Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Gly Leu Pro Ala Phe Ser
515 520 525

Tyr Ser Phe Phe Val Ile Arg Asn Ala Lys Val Ala Ala Cys Ile
530 535 540

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide
useful as sense primer for the amplification of
human heparanase cDNA

<400> 3

cctgaaggct ggtggagaag tgat

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide
useful as antisense primer for the amplification
of human heparanase cDNA

<400> 4

gccagctgca aaggtgtcgg atag

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/EP 00/11441

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/715 A61P9/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data, PAJ, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | WO 99 23214 A (UNIV PENNSYLVANIA ;LIANG BRUCE T (US)) 14 May 1999 (1999-05-14) page 7, line 24 page 13, line 5 page 47, line 24-26 claims 21,30 | 1-6 |
| Y | WO 99 43830 A (FAIRBANKS MICHAEL B ;HEINRIKSON ROBERT L (US); MILDNER ANA M (US);) 2 September 1999 (1999-09-02) page 1, line 5 - line 12 page 14, line 7 - line 13 page 15, line 12 -page 16, line 10 page 2, line 9 - line 16 --- -/- | 1-7 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 March 2001

Date of mailing of the international search report

26/03/2001

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brunnauer, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int .tional Application No

PCT/EP 00/11441

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y | WO 96 08559 A (UNDERWOOD PATRICIA ANNE ;GRAHAM LLOYD (AU); CARDIAC CRC NOMINEES P) 21 March 1996 (1996-03-21) page 5, line 21 - line 29 ----- | 1-7 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/11441

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9923214 A | 14-05-1999 | AU 1370999 A | 24-05-1999 |
| WO 9943830 A | 02-09-1999 | AU 2759199 A | 15-09-1999 |
| | | EP 1060252 A | 20-12-2000 |
| WO 9608559 A | 21-03-1996 | AU 3514595 A | 29-03-1996 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int: Jonaes Aktenzeichen

PCT/EP 00/11441

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K31/715 A61P9/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data, PAJ, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | WO 99 23214 A (UNIV PENNSYLVANIA ;LIANG BRUCE T (US)) 14. Mai 1999 (1999-05-14) Seite 7, Zeile 24 Seite 13, Zeile 5 Seite 47, Zeile 24-26 Ansprüche 21,30 | 1-6 |
| Y | WO 99 43830 A (FAIRBANKS MICHAEL B ;HEINRIKSON ROBERT L (US); MILDNER ANA M (US);) 2. September 1999 (1999-09-02) Seite 1, Zeile 5 - Zeile 12 Seite 14, Zeile 7 - Zeile 13 Seite 15, Zeile 12 -Seite 16, Zeile 10 Seite 2, Zeile 9 - Zeile 16 | 1-7 |
| | -/-- | |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. März 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Brunnauer, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. : Jones Aktenzeichen

PCT/EP 00/11441

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| Y | <p>WO 96 08559 A (UNDERWOOD PATRICIA ANNE ; GRAHAM LLOYD (AU); CARDIAC CRC NOMINEES P) 21. März 1996 (1996-03-21) Seite 5, Zeile 21 - Zeile 29 -----</p> | 1-7 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11441

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9923214 A | 14-05-1999 | AU 1370999 A | 24-05-1999 |
| WO 9943830 A | 02-09-1999 | AU 2759199 A | 15-09-1999 |
| | | EP 1060252 A | 20-12-2000 |
| WO 9608559 A | 21-03-1996 | AU 3514595 A | 29-03-1996 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.